

**IDENTIFIZIERUNG BLUTDRUCKAKTIVER
SUBSTANZEN DER RINDERLINSE ALS
NUKLEOTIDE UND NUKLEOSID**

Mareike Keßler

1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553803_0092

Aus dem Klinisch-Chemischen Institut
an der Chirurgischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Werle

IDENTIFIZIERUNG BLUTDRUCKAKTIVER SUBSTANZEN DER
RINDERLINSE ALS NUKLEOTIDE UND NUKLEOSTD

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Höheren Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von
Mareike Keßler
aus Suhl
München 1971

Berichterstatter Prof. Dr.Dr. E. Werle

Mitberichterstatter Prof. M. Klingenberg

Dekan Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung 12. 10. 1971



Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

I.. Einleitung	1
----------------------	---

II.. Anreicherung der Substanzen

1.) Methodisches	4
2.) Anreicherung mittels Säurefällung	4
a) pH-Wert und Blutdruckaktivität	7
3.) Anreicherung und Isolierung der Substanzen mit chromatographischen Methoden	7
a) Adsorption an Dowex 2	8
b) Sephadex G-25 Gelfiltration	13

III.. Identifizierung der Substanzen

1.) Phosphatnachweis	17
2.) Pentosenachweis mit Bial's Reagenz	17
3.) Messung der UV-Spektren der Substanzen	18
a) Nachweis des Adenosinspektrums	18
b) Nachweis des Uridinspektrums	19
4.) Dowex- $\frac{n}{10}$ -Ameisensäureeluat	21
a) enzymatischer ADP/AMP-Nachweis	22
b) enzymatischer Nachweis von ATP	24
5.) Peak 2 nach Sephadex G-25	26
6.) Peak 1 nach Sephadex G-25	27
a) quantitative Uridinbestimmung	27
b) quantitative Phosphatbestimmung nach	

MARTIN und DOTY	28
c) qualitativer und quantitativer Kohlenhydratnachweis	30
aa) Glukosebestimmung	31
bb) Galaktosebestimmung	32
d) Identifizierung der Substanz	33

IV. Pharmakologische Betrachtungen über die blutdruckaktiven Substanzen der Rinderlinse

1.) Pharmakologie der Adenylsäuregruppe, insbesondere des Adenosinmonophosphates und des Adenosins	35
a) Wirkung auf das Herz	35
aa) Frequenz	35
bb) Herzkraft	36
cc) Überleitung	37
b) Koronargefäße	38
c) Blutdruck und periphere Gefäße	39
d) Gefäßverengung durch Adenosinverbindungen	39
e) glatte Muskulatur	40
f) pharmakologische Wirkung und chemische Konstitution	41
2.) Pharmakologische Untersuchungen des UDPG/UDPGA-Gemisches	42
a) Wirkung auf den Blutdruck, die Herzfre-	

quenz und die Koronardurchblutung	42
aa) Blutdruck	42
bb) Herzfrequenz	42
cc) Koronardurchblutung	43
b) Abgrenzung von den Katecholaminen	43
aa) Dosis-Wirkungs-Beziehung	43
bb) UDPG/UDPGA-Wirkung bei Blockade der Reizübertragung	44
c) UDPG/UDPGA und biogene Amine	44
d) UDPG/UDPGA und seine Wirkung auf glatte Muskulatur	45
aa) Suspensionsversuche	45
bb) Durchströmungsversuche	45
e) Angriffspunkt des UDPG/UDPGA	46
f) Vergleiche verschiedener Uridinnukleotide	47
 V. Diskussion	 48
 VI. Zusammenfassung	 51
 VII. Literatur	 54

I.. Einleitung

1931 beschrieb A.PASSOW, daß die i.v. Injektion von Linsen- oder Glaskörperpreßsäften keinerlei Einfluß auf die Blutdruckkurve eines narkotisierten Hundes ausübt, wohl aber Retina-, Uvea- und Sklerapreßsäfte eine depressorische Wirkung entfalten. A.PASSOW schrieb diese Aktivität einem in den Kapillarwänden der letztgenannten Gewebe produzierten Stoff zu, dessen chemische Struktur er aber nicht näher zu klären vermochte. Er nahm an, daß die Menge gebildeter Substanz proportional der Kapillardichte des jeweils untersuchten Gewebes sei, und führte die Unwirksamkeit der Linsen- als auch Glaskörperpreßsäfte auf die fehlende Kapillarisation dieser Organe zurück.

K.VELHAGEN konnte die Blutdrucksenkung nach i.v. Injektion von Retina-, Uvea- und Sklerapreßsäften teilweise auf einen dem Cholin ähnlichen Stoff zurückführen, da ihre Wirkung durch Atropin vermindert wurde. Die Extrakte der genannten Organe enthielten aber zusätzlich noch andere Stoffe, die nach Atropingabe an der Katze und am Kaninchen weiterhin blutdrucksenkend wirkten. K.VELHAGEN konnte jedoch nicht sicher feststellen ,

ob es sich möglicherweise um Histamin und Adenosinmonophosphat handelte..

Im Gegensatz zu A.PASSOW beobachteten E.WERLE und A. SCHMAL 1961, daß auch die i.v. Injektion eines Rinderlinsenhomogenates den Blutdruck eines narkotisierten Hundes zu ändern vermag, und zwar im Sinne einer anfänglichen, kurz andauernden Blutdrucksenkung, auf die eine länger anhaltende Blutdrucksteigerung folgt.

Eine zur vorläufigen Orientierung durchgeführte chemische Analyse des Rinderlinsenhomogenates ergab, daß es sich um mehrere niedermolekulare Substanzen handelte, von denen die blutdrucksenkende in alkalischer Lösung sehr stabil war, andererseits bei Kochen in 1 n HCl bereits nach kürzester Zeit ihre Wirksamkeit nahezu vollständig verlor. Das blutdrucksteigernde Prinzip wurde hingegen auch im alkalischen Milieu zerstört. Des weiteren wurden die Substanzen durch proteolytische Enzyme, wie Trypsin und Chymotrypsin, nicht angegriffen. Extrakte und Homogenate aus Leber und Niere zerstörten sie nur sehr langsam. Schließlich konnten sie sowohl papierchromatographisch als auch durch die Form ihrer Blutdruckkurven von anderen, nicht durch Proteasen beein-

flußbaren, blutdruckaktiven Substanzen, wie Adrenalin, Serotonin und Histamin, abgegrenzt werden.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Anreicherung und Identifizierung der blutdruckaktiven Substanzen sowie pharmakologische Grundlagen ihrer Wirkungsweise.

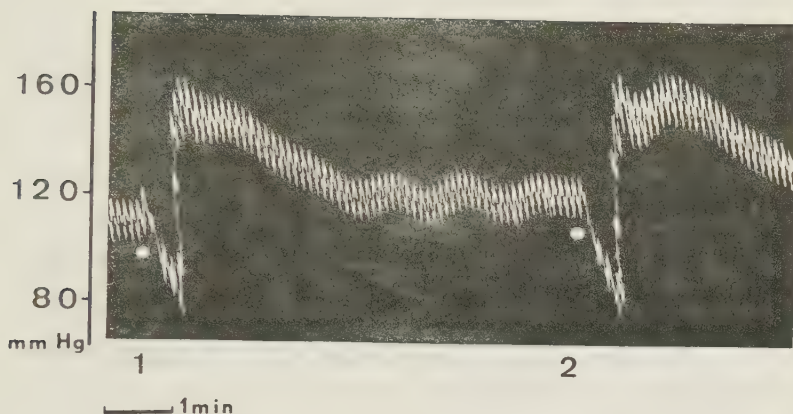
II. Anreicherung der Substanzen

1.) Methodisches

Vorauszuschicken ist, daß der Beurteilung eines durchgeführten Reinigungsschrittes die jeweilige Blutdruckveränderung am Hunde zugrunde liegt. Die Hunde, deren mittleres Gewicht 10 kg betrug, wurden mit Nembutal (5-Äthyl-5(1'methylbutyl)-barbitursäure, Natriumsalz) 0,5 ml/kg i.v. narkotisiert, beatmet und die zu testende Substanz in die v.femoralis injiziert. Der arterielle Druck wurde mit Hilfe eines Ludwig'schen Quecksilbermanometers in der a.carotis communis gemessen und kymographisch der Druckverlauf aufgezeichnet.

2.) Anreicherung mittels Säurefällung

550 g enukleierte Rinderlinsen wurden mit 2,5 l Aqua bidestillata aufgefüllt und im Starmix homogenisiert. Das Homogenisat bewirkte am narkotisierten Hund die schon eingangs beschriebene kurze Blutdrucksenkung mit anschließendem Blutdruckanstieg.



Hund, 10 kg, Nembutalnarkose; 1 und 2 = 5,0 ml
Rinderlinsenhomogenisat.

Abb. 1: Blutdruckkurve nach i.v. Injektion eines Rinderlinsenhomogenisates

Der ursprüngliche pH-Wert 7,2 des Homogenates wurde durch Ansäuern mit 2 n HCl auf pH 5 eingestellt, worauf massiv Eiweiß ausfiel. Zentrifugieren bei 6000 Umdrehungen erzielte eine gute Trennung der ausgefällten, hochmolekularen Linsenproteine vom Überstand. Die flüssige Phase enthielt fast die gesamte blutdruckwirksame Aktivität; dennoch wurde der Niederschlag, um den Verlust an wirksamer Substanz möglichst gering zu halten

noch mehrmals aufgeschwemmt, wiederum zentrifugiert und, als er am narkotisierten Hund keine Blutdruckveränderung mehr bewirkte, verworfen.

Der zurückbehaltene Überstand, eine klare, gelbliche Flüssigkeit, wurde, um eine zusätzliche Reinigung von noch vorhandenem Protein oder Fett zu erzielen, durch Faltenfilter Selecta Nr. 595 $1/2$ filtriert. Anschließend wurde die Lösung mit Bidest auf 7000 ml aufgefüllt.

Auswaschen des Überstandes mit organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Äther, Butanol oder Essigsäureäthylester, führte nicht zu einer weiteren Anreicherung der Substanzen.

Ebensowenig erfolgreich war eine Einengung im Rotationsverdampfer, die lediglich bei einem schwach sauren Überstand von pH 6 - 7 auf einen pH-Wert von 5 eine Anreicherung der blutdrucksteigernden Substanz im stark getrübbten Rückstand brachte, während die blutdrucksenkende Substanz bereits nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Bei niedrigeren pH-Werten wurde auch das blutdrucksteigernde Prinzip zerstört, während hinwiederum bei

höheren pH-Werten nur die blutdrucksteigernde, nicht aber die blutdrucksenkende Substanz unbeständig war.

a) pH-Wert und Blutdruckaktivität

Zusammenfassend zeigte die Überprüfung der pH-Abhängigkeit der Substanzen folgendes: bei Zimmertemperatur und saurem pH-Wert behielten beide ihre Blutdruckwirksamkeit bei, zudem war die blutdrucksteigernde Substanz im schwach Sauern (pH 5 - 7) hitzestabil, nicht aber bei höheren Säuregraden. Bei 20° C zeigte sich ab pH 11 schon nach einer Stunde ein völliger Verlust der blutdrucksteigernden Aktivität, der nach 20 Stunden bereits bei pH 8 - 9 eintrat. Der eingetretene Wirkungsverlust konnte auch durch ein Zurückstellen des pH-Wertes in den sauren Bereich nicht mehr behoben werden. Im Gegensatz dazu wurde die blutdrucksenkende Substanz im alkalischen Milieu selbst durch Kochen nicht zerstört, verlor jedoch bei Erhitzen in schwach saurer Lösung sofort ihre Wirksamkeit.

3.) Anreicherung und Isolierung der Substanzen mit chromatographischen Methoden

Versuche, die blutdruckaktiven Substanzen aus dem Überstand mittels Adsorption an Ionenaustauscher anzurei-

chern, zeigten, daß die Aktivität des Überstandes nach Verriihren mit Amberlite gar nicht, mit Dowex 50 um 20 %, mit Dowex 2 jedoch um 80 % abnahm. Zur weiteren Anreicherung wurde daher Dowex 2 verwendet.

a) Adsorption an Dowex 2

Es wurden 200 g Dowex 2, Vernetzung 1 x 8, 200 - 400 mesh, Chloridform, circa 2 Stunden in dem schwach sauren Überstand verriihrt und anschließend bei 6000 Umdrehungen abzentrifugiert. Der erhaltene Niederschlag enthielt etwa 80 % der gesamten Aktivität. Dowex wurde mehrmals mit Bidest gewaschen, jeweils abdekantiert und der getriibte Überstand, da er kaum Blutdruckwirksamkeit aufwies, verworfen. Mit dem Sediment wurde eine Säule (2,5 x 50 cm) gegossen und kontinuierlich mit $\frac{n}{10}$ -Ameisensäure eluiert. Der Durchlauf wurde mit einem Uvicord spektrophotometrisch bei 254 nm gemessen, seine Absorption automatisch aufgezeichnet und das Eluat fraktioniert zu je 10 ml aufgefangen. Bereits zu Beginn der Elution stiegen die Absorptionswerte rasch an, erreichten ein Maximum bei der 28. Probe, um bis zur 42. Probe allmählich wieder abzufallen.

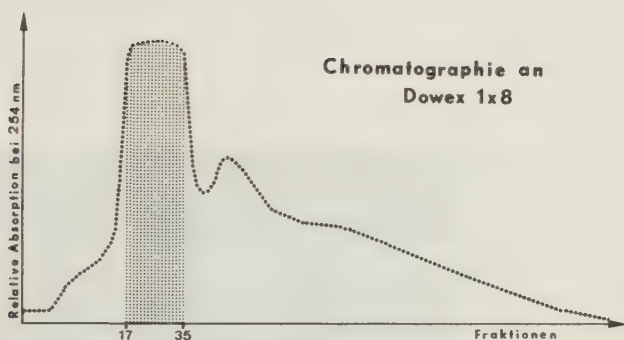
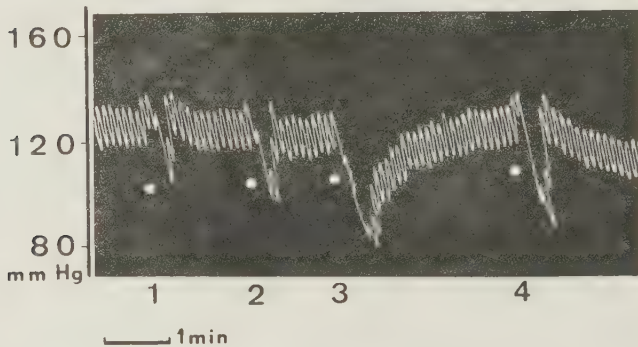


Abb. 2: Chromatographie an Dowex 1 x 8, $\frac{n}{10}$ - Ameisensäureelution. Bereich der aktiven und weiter aufgearbeiteten Fraktionen punktiert.

Eine Austestung der Blutdruckwirksamkeit der einzelnen Fraktionen ergab ein Zusammentreffen der hohen Absorptionswerte mit ersterer. Gleichermäßen wurde ein Nachlassen der Aktivität analog zur Abnahme der Absorptionswerte bis zur 42. Probe beobachtet. Die Wirkung der letzten Fraktionen war bereits so gering, daß nur die Proben 17 - 35 zur weiteren Aufarbeitung verwendet, die übrigen aber verworfen wurden. Die Austestung am Hund

erbrachte, daß das Eluat mit $\frac{n}{10}$ -Ameisensäure eine Substanz enthielt, die nurmehr blutdrucksenkende Eigenschaften aufwies.



Hund, 10 kg, Nembutalnarkose; 1 = 0,5 ml
Dowex $\frac{n}{10}$ -Ameisensäureeluat, 2 = 0,5 mg
AMP, 3 = 1 mg AMP, 4 = 1 ml Dowex $\frac{n}{10}$ -
Ameisensäureeluat

Abb. 3: Blutdrucksenkung nach i.v. Injektion steigender
Dosen des $\frac{n}{10}$ -Ameisensäureeluates nach Dowex

Dowex 2 wurde nun mit Bidest neutralgewaschen, ein
 $\frac{n}{10}$ -Ammonformiatpuffer von pH 5 hergestellt und mit dem
Puffer eine weitere Elution durchgeführt. Wiederum wur-
de das Eluat im Fraktionssammler zu Portionen à 10 ml

aufgefangen und die Absorption der eluierbaren Flüssigkeit gleichzeitig bei 254 nm automatisch mit einem Uvicord-Durchflußphotometer aufgezeichnet. Auch jetzt stiegen die Absorptionswerte rasch an, um ein Maximum bei der 29. Probe zu erreichen, dann jedoch bis zur 60. Fraktion kontinuierlich wieder abzufallen. Die Fraktionen 20 - 50 gelangten zur weiteren Aufarbeitung

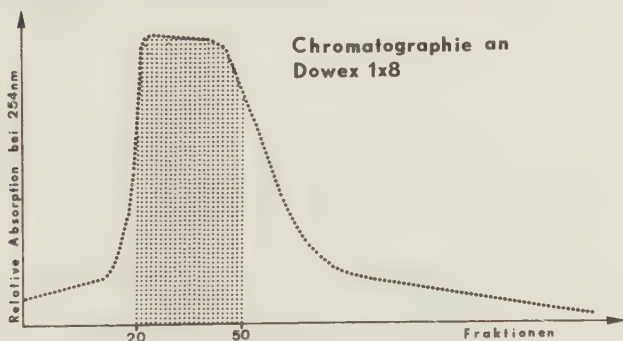
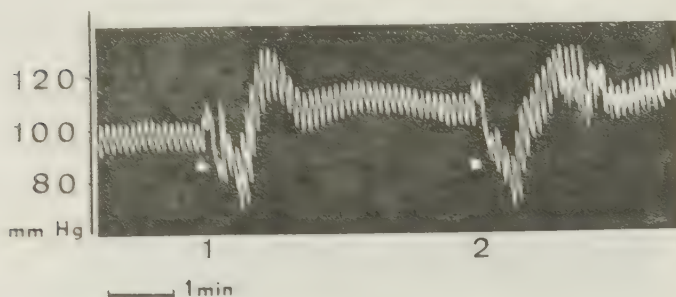


Abb. 4: Chromatographie an Dowex 1 x 8, $\frac{n}{10}$ - Ammonformiatelution. Bereich der aktiven und weiter aufgearbeiteten Fraktionen punktiert.

Eine Austestung der Blutdruckaktivität ergab ebenfalls Aktivitäten, die parallel zu den Absorptionswerten lagen, und zwar folgte auf einen raschen Blutdruckabfall jeweils ein länger anhaltender Blutdruckanstieg.



Hund, 11 kg, Nembutalnarkose; 1 und 2 = 2
ml Dowex $\frac{n}{10}$ -Ammonformiateluat.

Abb. 5: Blutdruckkurve nach i.v. Injektion des $\frac{n}{10}$ -
Ammonformiateluates nach Dowex.

Sämtliche Fraktionen, sowohl die nach $\frac{n}{10}$ -Ameisensäure als auch die nach $\frac{n}{10}$ -Ammonformiatelution erhaltenen, wurden lyophilisiert. Nach 24 Stunden erhielt man teils flockige, teils kristalline, gelblich weiße Lyophilisate. Um

die kristallinen Bestandteile, die als Formiat bzw. Ammonformiat anzusehen waren, zu verringern, wurde der Prozeß mehrere Male wiederholt.

Da die Wirkung des Ammonformiateluates nicht einheitlich war, lag der Schluß nahe, daß es sich bei dem Eluat noch um ein Gemisch verschiedener Substanzen handelte, von denen eine jede ihren spezifischen Einfluß auf die Blutdruckkurve des Hundes nahm. Um eine weitere Auftrennung zu erzielen, wurde eine Sephadex-Gelfiltration durchgeführt.

b) Sephadex G-25 Gelfiltration

Sephadex G-25 fine wurde in 5 l Bidest aufgeschlemmt und feinste Dextranpartikel abdekantiert. Mit dem Sediment wurde eine Säule (2,5 x 50 cm) gegossen. Das Ivo-nhilisat nach Dowex $\frac{n}{10}$ -Ammonformiatelution wurde zu je 100 mg in 2 ml Bidest gelöst und damit die Säule gleichmäßig beschickt. Bidest wurde aus einem Reservoir als Fließmittel angesaugt. Wie oben beschrieben wurde auch jetzt im Durchfluß die Absorption bei 254 nm mit einem Uvicord-Durchflußphotometer gemessen, aufgezeichnet und der Durchlauf fraktioniert aufgefangen. Insgesamt wurden 6 Sephadex G-25 Säulen beschickt. Die graphische Uvicord-

Darstellung des Durchlaufs wies drei deutlich voneinander getrennte Gipfel auf.

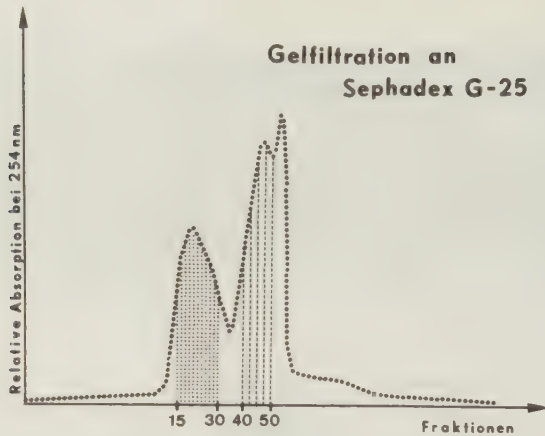
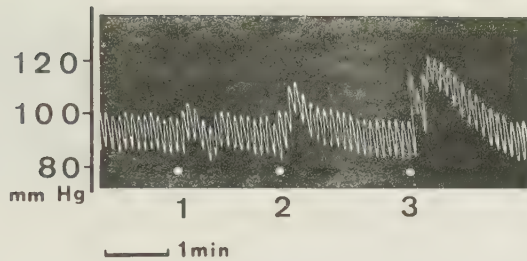


Abb. 6: Gelfiltration an Sephadex G-25 fine. Blutdrucksteigernde Fraktionen punktiert, blutdrucksenkende Fraktionen gestrichelt.

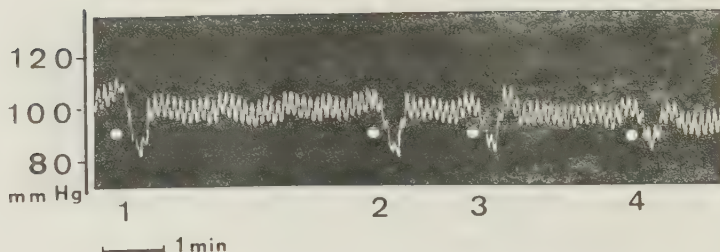
Durch Austestung am narkotisierten Hund konnte
1. in Peak 1 eine blutdrucksteigernde Substanz



Hund, 10 kg, Nembutalnarkose; 1 =
0,5 ml von Peak 1 nach Sephadex
G-25, 2 = 1 mg UDPG/UDPGA, 3 = 2
ml von Peak 1 nach Sephadex G-25.

Abb. 7: Blutdrucksteigerung nach i.v. Injektion stei-
gender Dosen von Peak 1 nach Sephadex G-25.

2. in Peak 2 eine blutdrucksenkende Substanz



Hund, 9 kg, Nembutalnarkose; 1 = 1,5 ml, 2 = 1,0 ml, 3 = 1,0 ml, 4 = 0,5 ml von Peak 2 nach Sephadex G-25.

Abb. 8: Blutdrucksenkung nach i.v. Injektion verschiedener Dosen von Peak 2 nach Sephadex G-25.

3. in Peak 3 eine auf den Blutdruck des Hundes unwirksame Substanz lokalisiert werden.

Peak 3 wurde daher verworfen, während die gesammelten Fraktionen des 1. und 2. Gipfels lyophilisiert wurden. Das Lyophilisat erwies sich als feinflockiger und salzärmer als nach Dowex 1 x 8 Elution.

III. Identifizierung der Substanzen

Bereits aus dem pH-abhängigen Verhalten der Substanzen war ersichtlich, daß sie nicht in die Stoffgruppe der Proteine einzuordnen waren. Die Biuretreaktion fiel, wie erwartet, negativ aus, während ein Phosphat- und Pentosenachweis sowie spektrophotometrische Untersuchungen einen ersten Hinweis auf eine Nukleotid- bzw. Nukleosidstruktur der Substanzen gaben.

1.) Phosphatnachweis

Es wurde von jeder Substanz etwas Lyophilisat in Bidest gelöst und mit HCl angesäuert. Die Lösungen wurden mehrmals in konzentrierter HNO_3 eingeengt, schließlich im Überschuß salpetersaures Ammoniummolybdat hinzugefügt und bis zum Kochen erhitzt. Das Ausfallen von feinkörnigem, gelben Ammoniumphosphomolybdat zeigte bei dem Dowex-eluat und Peak 1 nach Sephadex G-25, nicht aber bei Peak 2, Phosphorgehalt an.

2.) Pentosenachweis mit Bial's Reagenz

Die spezifische Nachweisreaktion für Pentosen nach Bial verlief hingegen bei allen drei Stoffen positiv. 4 - 5 ml Bial-Reagenz wurden bis zum Sieden erhitzt und von

jeder Substanz 3 ml gelöstes Lyophilisat hinzugefügt. Nach kurzem Kochen trat in allen Proben eine Grünfärbung auf, die das Vorhandensein von Pentosen bestätigte. Die Grünfärbungen waren mit Amylalkohol extrahierbar..

3.) Messung der UV-Spektren der Substanzen

Ein weiterer Schritt in der Aufklärung der Struktur der Substanzen war die Messung ihrer UV-Spektren. Da bei Nukleotiden die UV-Absorption abhängig vom pH-Wert und der damit verbundenen Dissoziation ist, mußten, um reproduzierbare Absorptionswerte zu erhalten, Lösungen hergestellt werden, in denen nur eine Ionenart der betreffenden Substanz vorlag. Dies trifft für die pH-Bereiche zu, welche um mindestens 2 pH-Einheiten vom pK-Wert der betrachteten Substanz entfernt liegen. Es wurde daher je 1 mg der Substanzen in Bidest gelöst, auf 3 Gläser verteilt und der pH-Wert auf pH 1, pH 6 bzw. pH 8 und pH 14 eingestellt. Die Spektren wurden bei einer Wellenlänge von 200 - 300 nm gemessen.

a) Nachweis des Adenosinspektrums

Dowex $\frac{n}{10}$ -Ameisensäureeluat und Peak 2 nach Sephadex G-25 wiesen gleiche Absorptionsminima und -maxima auf. Das

Absorptionsminimum lag bei allen pH-Werten um 230 nm, das Absorptionsmaximum wiederum bei allen pH-Bereichen bei 260 nm. Vergleiche mit UV-Spektrogrammen verschiedener Nukleotide ließen in beiden Fällen auf eine adenosinhaltige Substanz schließen.

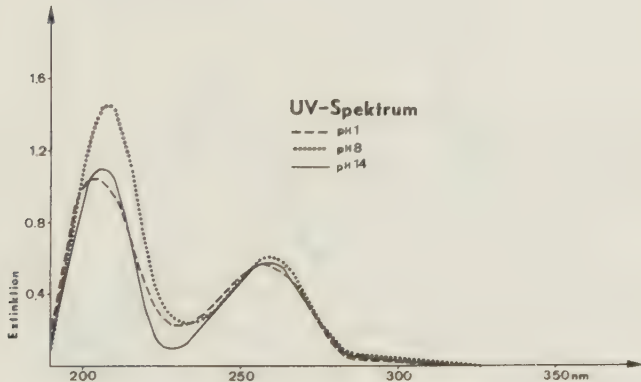


Abb. 9: UV-Spektrum der beiden blutdrucksenkenden Substanzen bei verschiedenen pH-Werten.

b) Nachweis des Uridinspektrums

Bei Peak 1 nach Sephadex G-25 hingegen lagen die Maxima

bei jedem pH-Wert bei 260 nm, die Minima in neutraler und in saurer Lösung bei 230 nm, während eine für Urudin typische Verschiebung des Minimums im alkalischen Milieu nach 240 nm auftrat.

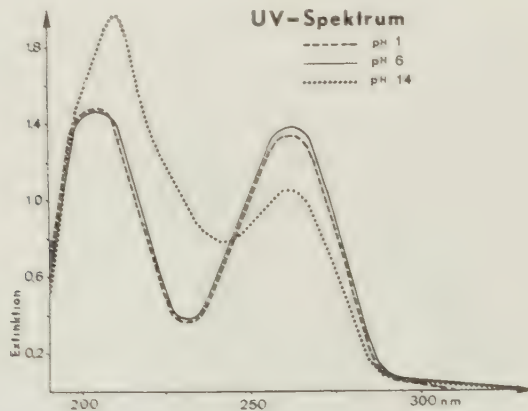


Abb. 10: UV-Spektrum der blutdrucksteigernden Substanz bei verschiedenen pH-Werten.

Bei allen drei Spektren war bemerkenswert, daß eine auf eine geringe Menge Protein deutende Absorption bei einer Wellenlänge von 220 nm fehlte. Offenbar war es gelungen,

mit den vorangegangenen Reinigungsschritten das gesamte Linseneiweiß zu entfernen.

Bereits die Einheitlichkeit der Spektren ließ den Schluß zu, daß es sich bei den blutdruckwirksamen Substanzen nicht um hochmolekulare Nukleinsäuren handelte; zudem verlief ein Ausfällungsversuch mit Protaminsulfat, der bei hochmolekularen Nukleinsäuren positiv ist, negativ.

Im folgenden unterscheiden sich die bei der Identifizierung der einzelnen Substanzen unternommenen Schritte. Jede Substanz wird daher in einem eigenen Abschnitt besprochen, wobei Peak 2 nach Sephadex G-25 nach dem Dowex $\frac{n}{10}$ -Ameisensäureeluat abgehandelt wird, da es mit diesem das Adenosinspektrum wie auch die blutdrucksenkende Eigenschaft gemeinsam hat.

4.) Dowex $\frac{n}{10}$ -Ameisensäureeluat.

Da das UV-Spektrum auf einen adenosinhaltigen Stoff deutete, und sowohl der Phosphat- als auch Pentosenachweis positiv ausgefallen waren, wurde versucht, mittels Boehringer Biochemica Test Combination den enzymatischen Nachweis für ATP zu erbringen. Die Extinktionswerte E_1 und E_2 wurden jedoch beide mit 1,0 abgelesen, so daß ATP als

blutdrucksenkendes Prinzip der Rinderlinse auszuschließen war. Aufklärung über die Struktur der Substanz brachte hingegen eine enzymatische Bestimmung von ADP/AMP, ebenfalls eine Boehringer Biochemica Test Combination.

a) enzymatischer ADP/AMP-Nachweis

Das Prinzip der enzymatischen Reaktion lehnt sich an die Angaben von F. LIPMANN und TH. RUCHER an: Adenosin-5-diphosphat wird in einer von Pyruvat-Kinase (PK) katalysierten Reaktion durch Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Adenosintriphosphat phosphoryliert.

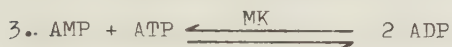


Es entsteht eine der vorliegenden ADP-Konzentration äquivalente Pyruvatmenge, die wiederum enzymatisch in einer durch Laktatdehydrogenase (LDH) katalysierten Reaktion bestimmt wird.



Das hierbei verbrauchte $\text{NADH} + \text{H}^+$ ist äquivalent der umgesetzten Menge ADP. Die Umsetzung $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD wird mittels der Extinktionsänderung gemessen. Nach vollständigem Umsatz des vorliegenden ADP gemäß Gleichung 1 und 2 wird AMP in demselben Reaktionsansatz bestimmt, indem es unter Myokinasekatalyse (MK) mit Hilfe des aus der

ADP-Bestimmung gewonnenen ATPs in ADP umgesetzt wird.



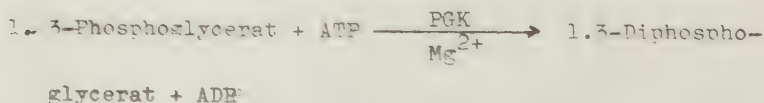
Das Reaktionsprodukt, 2 Mole ADP pro Mol AMP, wird wie bereits oben beschrieben gemessen. Für diese erneute ADP-Bestimmung zur Ermittlung des AMP-Gehaltes reichen die im Reaktionsansatz enthaltenen Hilfsreagenzien noch reichlich aus. Die Reaktion gemäß Gleichung 3 braucht lediglich durch Myokinase gestartet zu werden.

Die Messungen wurden im Eppendorf bei einer Wellenlänge von 366 nm gegen Luft durchgeführt; die verwendete Glasküvette hatte eine Schichtdicke von 1 cm, die Temperatur betrug 22° C. In der auf 1 : 10 verdünnten Probe des $\frac{n}{10}$ -Ameisensäureeluates wurden die Extinctionen $E_1 = 1,33$, $E_2 = 1,33$ und $E_3 = 0,55$ abgelesen. Nach den angegebenen Testbedingungen wird $\Delta E (E_1 - E_2)$ mit 34,5 multipliziert, um den mg-Gehalt ADP/100 ml Probe zu erhalten: $(1,33 - 1,33) \times 34,5 = 0 \text{ mg \% ADP}$. Um den mg-Gehalt AMP/100 ml Eluat zu berechnen, wird das Ergebnis aus $E_2 - E_3$ mit 14 multipliziert. Bei der gewählten Verdünnung 1 : 10 waren $(1,33 - 0,55) \times 14 \times 10 = 109,2 \text{ mg}$ AMP in 100 ml Eluat. Die insgesamt 54 ml Eluat enthielten demnach 58,97 mg AMP.

Bemerkenswert war, daß trotz Fehlens von ATP und ADP, welche die Nachweisreaktion für AMP laut Reaktionsschema erst starten, diese dennoch ablief. Es mußten in der Lösung also Spuren einer der beiden Substanzen vorhanden gewesen sein, die jedoch so gering waren, daß sie sich an Hand der Boehringer Biochemica Test Combination für ATP und ADP nicht nachweisen ließen. Um das Ergebnis zu überprüfen, wurde daher eine Auswertung nach den Boehringer Test Bestimmungen mit 5 Rinderlinsen durchgeführt, die, frisch nach dem Schlachten entnommen, sofort in Kohensäureschnee eingefroren wurden, um einen eventuellen Abbau der Substanzen zu verhindern.

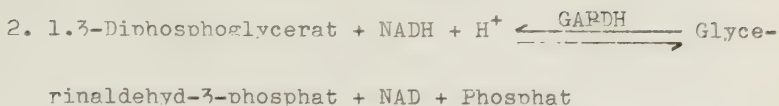
b) enzymatischer Nachweis von ATP

Nach Homogenisierung der Rinderlinsen wurde im Homogenat die folgende, von H.ADAM beschriebene Reaktion durchgeführt: In einer ersten Reaktion katalysiert Phosphoglycerat-Kinase (PGK) die Phosphorylierung von 3-Phosphoglycerat mittels ATP:



Das gebildete 1.3-Diphosphoglycerat wird durch $\text{NADH} + \text{H}^+$ und Glycerinaldehyddehydrogenase (GAPDH) reduziert. Es

entsteht Glycerinaldehyd-3-phosphat.



Die verbrauchte Menge $\text{NADH} + \text{H}^+$ entspricht der umgesetzten ATP-Menge. Die Umsetzung $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD wurde im Eppendorf bei 366 nm gegen Luft gemessen. Die Temperatur betrug 22°C . Die verwendete Glasküvette hatte eine Schichtdicke von 1 cm. Die Extinktionswerte E_1 und E_2 wurden mit $E_1 = 1,08$ und $E_2 = 1,02$ abgelesen. Nach den Angaben von Boehringer Biochemica Test Combination wird $\Delta E (E_1 - E_2)$ mit 398 multipliziert, um die Menge ATP in mg pro 100 ml Probe zu erhalten. $(1,08 - 1,02) \times 398 = 23,88 \text{ mg \% ATP}$. Bei 10 ml Homogenat entsprach das 2,4 mg ATP, erhalten aus insgesamt 5 frisch aufbereiteten Rinderlinsen..

Wurde der gleiche Versuch nach kurzer Zeit unter den bereits angegebenen Testbedingungen wiederholt, so war im Homogenat kein ATP mehr nachweisbar, statt dessen wurde nunmehr der ADP-Nachweis positiv, um ebenfalls nach einiger Zeit negativ auszufallen. Schließlich ließ sich nur noch AMP in der Lösung bestimmen. Da ATP, ADP und AMP innerhalb des Körpers bei ihrer Funktion ineinander über-

gehen und sie, wie HERBRAND nach v.BERTALANFFY zitiert, in einem ständigen Fließgleichgewicht stehen, waren also offensichtlich die zur Auslösung der AMP-Nachweisreaktion benötigten Spuren an ATP oder ADP vorhanden, und das bestimmte AMP letztlich nur ein Abbauprodukt des ursprünglichen ATEs. Für die Richtigkeit dieser Annahme sprechen die Untersuchungen von MANDEL, NORDMANN und ZIMMER, die bereits 1949 das Vorkommen von ATP in der Rinderlinse sicherten, als auch eine von DAILY et al. sowie BERARDI-NIS und DE ROSA vornehmlich im Linsenepithel lokalisierte ATPase und Pyrophosphatase.

5.) Peak 2 nach Sephadex G-25

Das Spektrum der blutdrucksenkenden Substanz hatte auf Adenosin verwiesen. Der Pentosenachweis nach Bial war positiv ausgefallen, nicht aber der Phosphatnachweis, auch war ein Fällungsversuch mit Uranylazetat, der bei Veresterung der Pentose mit Phosphorsäure positiv verläuft, negativ. Das wirksame Prinzip wurde daher im Hinblick auf den bereits beschriebenen Abbau von ATP durch eine ATPase und Pyrophosphatase als weiteres Abbauprodukt, nämlich als das Nukleosid Adenosin, erkannt. Bereits J.H. GADDUM und H.SCHILD hatten bei der Aufarbeitung verschiedenster Organextrakte beobachtet, daß die Wirkung des ursprüng-

lich isolierten AMPs in der ersten Stunde der Autolyse sich um 75 % verminderte, ohne allerdings später noch weiter abzunehmen. Nur bei entsprechender Arbeitsweise hatten sie ADP oder andere Phosphorylierungsstufen des Adenosins erhalten. Diese Befunde stimmen mit denen überein, die bei der Isolierung der blutdrucksenkenden Substanzen der Rinderlinse gemacht werden konnten.

Möglicherweise handelte es sich bei Peak 3 nach Sephadex G-25 ebenfalls um ein Abbauprodukt des ATPs, nämlich dem Adenin, dem keine pharmakologische Wirksamkeit zukommt, denn diese hängt außer von der Intaktheit der Aminogruppe nicht zuletzt auch von der Bindung an Zucker und vom Grade der Phosphorylierung ab (W. HERBRAND).

6.) Peak 1 nach Sephadex G-25

Das UV-Spektrum der blutdrucksteigernden Substanz deutete auf ein uridinhaltiges Nukleotid hin; Phosphat- und Pentosenachweis waren positiv ausgefallen. Zur weiteren Aufklärung der Struktur der Substanz wurden die molaren Verhältnisse von Base und Phosphor bestimmt.

a) quantitative Uridinbestimmung

Die molare Uridinkonzentration einer Lösung kann an Hand

der bekannten molaren Extinktionskoeffizienten für Uridin berechnet werden. ϵ beträgt bei pH 7 und 260 nm 9,9/mmol Uridin/l und bei pH 12 und 262 nm 8,5/mmol Uridin/l. Zur quantitativen Uridinbestimmung wurden 0,1 mg des Lyophilisates von Peak 1 nach Sephadex G-25 in 2 ml Puffer gelöst und die Extinktionen bei pH 7 und 260 nm bzw. pH 12 und 262 nm gemessen. Diese Werte sind direkt proportional dem Produkt aus Konzentration und molarem Extinktionskoeffizienten. Bei der angegebenen Konzentration von 0,1 mg Lyophilisat in 2 ml Puffer betragen die mittleren Extinktionswerte bei pH 7 und 260 nm $E = 0,35$ und bei pH 12 und 262 nm $E = 0,31$. Es ergaben sich daraus Uridinkonzentrationen von

a) $\frac{0,35}{9,9} = 0,035 \times 20 = 0,7 \text{ mmol Uridin/l}$

b) $\frac{0,31}{8,5} = 0,036 \times 20 = 0,72 \text{ mmol Uridin/l}$

als Mittelwert 0,71 mmol Uridin/l, wenn 1 mg Lyophilisat in 1 ml Puffer gelöst ist.

b) quantitative Phosphatbestimmung nach MARTIN und DOTY
Nach feuchter Veraschung wird in einem stark sauren, wäßrigen Milieu ein Phosphormolybdänsäurekomplex gebildet. Der Komplex wird mit organischem Lösungsmittel extrahiert, und nach Verdünnung mit Alkohol im Lösungsmittel die Re-

duktion zu Molybdänblau in schwach saurem Milieu durch SnCl_2 durchgeführt. Nach 15 Minuten wird bei 740 nm colorimetriert. Die quantitative Phosphatbestimmung wird mit Hilfe einer Eichkurve durchgeführt.

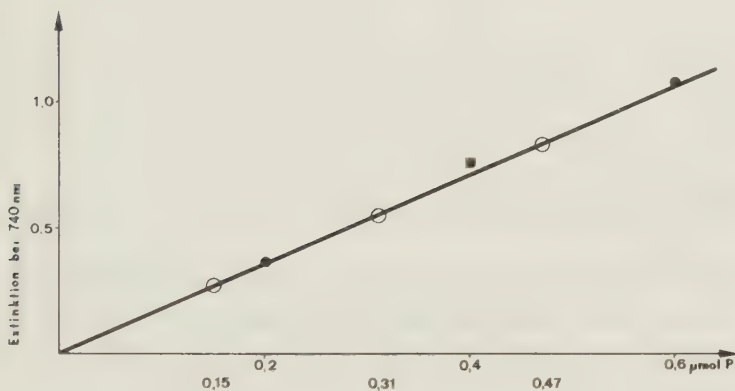


Abb. 11: Quantitative Phosphatbestimmung, Eichkurve.

Die bei dem Versuch eingesetzten Proben, die mittleren Extinktionswerte als auch die aus der Eichkurve ablesbaren Phosphatwerte werden in der folgenden Tabelle aufgeführt::

Proben		E_{Mittel}	$\mu\text{mol P}$
	0,1 mg Lyo-	0,28	0,15
	0,2 mg phili-	0,55	0,31
ver-	0,3 mg sat	0,84	0,47
ascht!	0,2 $\mu\text{mol P}$	0,37	0,2
	0,4 " "	0,77	0,4
	0,6 " "	1,12	0,6
	Leerwert	-	-
nicht	0,2 $\mu\text{mol P}$	0,37	0,2
ver-	0,4 " "	0,76	0,4
ascht!	0,6 " "	1,09	0,6

Als Mittelwert wurde ein Phosphatgehalt von 0,138 $\mu\text{mol P/}$ 0,1 mg Lyophilisat gefunden; bei Lösung von 1 mg in 1 ml eine Konzentration von 1,38 mmol P/l. Setzt man die ermittelten Uridin- und Phosphatwerte in Beziehung zueinander, so resultiert ein molares Verhältnis von 0,71 : 1,38, also angenähert 1 : 2. Das aus der Rinderlinse isolierte Uridin liegt demnach als Diphosphat vor.

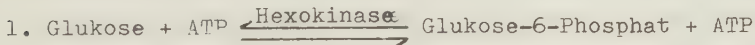
c) qualitativer und quantitativer Kohlenhydratnachweis
E.WERLE, A.SCHMAL und H.P. ZACH hatten bereits 1967 beschrieben, daß Uridindiphosphat fast keine pharmakologi-

sche Wirkung auf den Blutdruck des Hundes hat, und daß sich eine blutdrucksteigernde Aktivität nur bei Uridinphosphatzuckern oder deren Derivaten findet. Der Umstand, daß der Uridingipfel des Rinderlinsenhomogenates nicht durch saure Monophosphatase angegriffen wurde, deutete auch in diesem Fall auf eine Veresterung der Phosphorsäure hin. Zudem fiel der Kohlenhydratnachweis mit Anthonreagenz positiv aus.

Die nähere Analyse der Zucker erfolgte nach Hydrolyse mit 0,01 M HCl, 5 min bei 100° C mit Biochemica Test Combinationen der Firma Boehringer & Söhne, Mannheim, für Glukose und Galaktose. Um freien Zucker auszuschließen, wurden die Untersuchungen jeweils im Hydrolysat als auch in der nicht hydrolysierten Lösung ausgeführt.

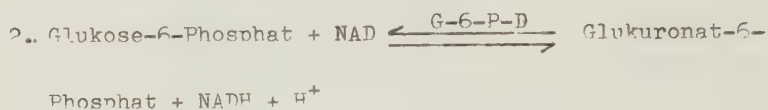
aa) Glukosebestimmung

Die Methode der Glukosebestimmung lehnt sich an die Angaben von F.H. SCHMIDT an. Glukose wird katalysiert durch Hexokinase enzymatisch durch ATP zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert..



Durch das Enzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-D)

wird Glukose-6-Phosphat in Gegenwart von NAD in Glukuronat-6-Phosphat übergeführt.



Das aus NAD entstehende $\text{NADH} + \text{H}^+$ ist Meßgröße und auf Grund seiner Absorption bei 366 nm und 22° C im Eppendorf gegen Luft zu bestimmen. Erfolgreich verlief die Messung nur in der hydrolysierten Lösung. Das Vorhandensein freier Glukose war somit auszuschließen. Bei Lösung von 1 mg Substanz in 1 ml Flüssigkeit konnten die Extinktionswerte mit $E_1 = 0,95$ und $E_2 = 1,03$ abgelesen werden. Nach den Testbedingungen wird $\Delta E (E_2 - E_1)$ mit 0,823 multipliziert, um den mg-Gehalt Glukose/ml eingesetzte Probe zu erhalten: $(1,03 - 0,95) \times 0,823 = 0,66 \text{ mg Glukose/ml}$. Bei Lösung von 1 mg der blutdrucksteigernden Substanz in 1 ml entsprach das 0,37 mmol Glukose/l.

bb) Galaktosebestimmung

Die Methode wurden von K.WALLENFELS et al. beschrieben und fußt darauf, daß Galaktose durch NAD zu Galaktonolakton oxydiert wird. Die Reaktion erfolgt unter Katalyse von Galaktose-Dehydrogenase (G-D).



Die während der Reaktion gebildete Menge an $\text{NADH} + \text{H}^+$ ist Meßgröße, da sie der Galaktosemenge entspricht. Sie wird nach 30 min bei 366 nm und 20°C im Eppendorf gegen Luft gemessen. Bei Lösung von 1 mg Substanz in 1 ml Flüssigkeit betrug E_1 1,13 und E_2 1,2. $\Delta E (E_2 - E_1)$ wird mit 0,905 multipliziert. Der errechnete Galaktosegehalt $(1,2 - 1,13) \times 0,905 = 0,063 \text{ mg/ml}$ ergab bei Umrechnung eine molare Konzentration von $0,35 \text{ mmol/l}$. Auch bei dieser Bestimmung konnte nur in der hydrolysierten Lösung Zucker nachgewiesen werden.

d) Identifizierung der Substanz

In der blutdrucksteigernden Substanz fanden sich Glukose und Galaktose in einem Mengenverhältnis von 37 : 35, also angenähert 1 : 1. In 1 mg Substanz konnten $0,72 \mu\text{mol}$ dieser Zucker nachgewiesen werden. Setzt man diesen Wert in Beziehung zu den molaren Uridin- bzw. Phosphatmengen/mg Substanz, so ergibt sich ein molares Verhältnis für Uridin : Phosphat : Zucker wie 0,71 : 1,38 : 0,72, d.h. die blutdrucksteigernde Substanz aus Rinderlinsen kann als ein Gemisch aus gleichen Teilen Uridindiphosphatglukose und Uridindiphosphatgalaktose, im folgenden als UDPG/UDPGA bezeichnet, identifiziert werden. Aus 550 g Rinderlinsen wurden 45 mg des UDPG/UDPGA-Gemisches isoliert.

Vergleichende elektrophoretische Untersuchungen mit synthetisierter UDP-Glukose (Na-Salz, Fa. Boehringer & Soehne) bzw. UDP-Galaktose (Na-Salz, Fa. Calbiochem) sicherten diesen Schluß. Bei pharmakologischer Prüfung erwiesen sich gleiche Gewichtsmengen der isolierten Substanz, UDP-Glukose und UDP-Galaktose als gleich wirksam.

IV. Pharmakologische Betrachtungen über die blutdruck- aktiven Substanzen der Rinderlinse

Der folgende Abschnitt gibt eine kurze Übersicht über die pharmakologische Wirkung der aus Rinderlinsen isolierten blutdruckaktiven Substanzen auf das Herz, die Koronardurchblutung, den Kreislauf und die glatte Muskulatur.

1.) Pharmakologie der Adenylsäuregruppe, insbesondere des Adenosinmonophosphates und des Adenosins
DRURY und SZENT-GYÖRGYI beschrieben 1929 erstmalig die pharmakologischen Eigenschaften des von LEVENE und JACOBS als Komponente der Hefenukleinsäure gefundenen Adenosins sowie des von BASS in menschlichen Erythrocyten entdeckten Adenosinmonophosphates. Bei allen mit den Adenosinverbindungen durchgeführten pharmakologischen Untersuchungen mußte jedoch bedacht werden, daß die bei ihrer Injektion auftretenden Reaktionen rein pharmakologischer Art waren und nicht mit der physiologischen Bedeutung der injizierten körpereigenen Substanzen gleichgesetzt werden konnten.

a) Wirkung auf das Herz

aa) Frequenz

Die auffälligste Erscheinung nach Injektion von Adenosinverbindungen ist eine Verlangsamung der Herzfrequenz. Die Bradykardie beruht einmal auf einer Verlangsamung des Sinusrhythmus, die durch unmittelbare Wirkung auf den Sinusknoten hervorgerufen wird, sodann aber auf der Ausbildung eines Herzblockes durch Beeinflussung des Reizleitungssystems (DE CARO); dabei steht bei manchen Tierspezies die Wirkung auf den Sinusknoten, bei anderen wiederum die auf das His'sche Bündel im Vordergrund. Die Bradykardie ist durch Atropin nicht zu beeinflussen, nur bei der Katze tritt zudem noch eine sekundäre Verlangsamung vagalen Ursprungs auf, die durch Injektion von Atropin zu beseitigen ist (DRURY und SZENT-GYÖRGYI). Auch am Menschen tritt nach Injektion von Adenosinverbindungen eine Verlangsamung der Herzfrequenz auf (HONEY, RITCHIE und THOMSON; ROTHMAN).

bb) Herzkraft

Nach Injektion von Adenosinverbindungen findet sich eine Verstärkung der Aktion der Vorhofmuskulatur, die unabhängig vom Ventrikelschlag auftritt (DRURY und SZENT-GYÖRGYI). Am Hund mit intaktem Kreislauf führt die Injektion von Adenosin oder AMP zum Schwächerwerden der Herzkontraktionen, was nur zum Teil auf der gleichzeitigen Frequenzver-

minderung beruht, da die genannten Stoffe die gleiche Wirkung haben, wenn die Frequenz mittels elektrischer Reizung konstant gehalten wird (BENNET und DRURY).

Pharmakologische Dosen haben auch am Menschen eine negativ inotrope Wirkung. Andere Untersuchungen zeigten, daß Dosen von AMP, nicht aber von Adenosin, die sogar einen vorübergehenden Herzstillstand zu erzeugen vermögen, wohl eine negativ inotrope Wirkung haben, diese aber nach kürzester Zeit in eine Verstärkung der Kontraktionskraft übergeht (OSTERN und PARNAS; FLEISCH und WEGER; DUBOIS-FERRIERE). Adenosin hat im Vergleich zu seinen verschiedenen Phosphorylierungsstufen bei bestimmten Tierarten keine Verstärkung des Herzschlages zur Folge (PARNAS und OSTERN).

cc) Überleitung

Adenosin und AMP verursachen beim Meerschweinchen einen vollständigen Herzblock, beim Hund und bei der Katze jedoch nur einen unvollständigen Herzblock. Bei letzteren ist wohl die Frequenz so stark vermindert, daß dem spezifischen Reizleitungssystem eine längere Erholungsphase zur Verfügung steht, und damit der Ausbildung eines totalen Herzblockes entgegensteht. Wird die Frequenz durch elektrische Reize konstant gehalten, so kann ein vollständiger

diger Block auftreten (DRURY und SZENT-GYÖRGYI). Adenosinverbindungen haben auch am Menschen negativ dromotrope Wirkung (HONEY, RITCHIE und THOMSON).

b) Koronargefäße

Adenosinverbindungen haben die Fähigkeit, die Herzkranzgefäße zu erweitern (DRURY und SZENT-GYÖRGYI; RIGLER; DRURY). Diese Wirkung tritt besonders auch beim Menschen auf. Adenosin wirkt dabei etwa 20 mal stärker als Amylnitrit, und zwar nicht nur an den normalen, sondern auch an den mit Bariumchlorid verengerten Koronarien (DRURY). Die Wirkung von Adenosin und AMP auf den Koronardurchfluß ist ohne Bezug auf eine gleichzeitige Blutdrucksenkung, so daß eine Durchflußvermehrung auch dann beobachtet werden kann, wenn keine Blutdrucksenkung auftritt. Die Koronarien reagieren dabei empfindlicher auf Adenosinverbindungen als die übrigen Gefäße des Körpers (DRURY). Ebenso tritt die Vermehrung des Durchflusses auf, bevor sich ein Herzblock ausbildet. Auch die negativ chronotrope Wirkung steht in keiner deutlichen Beziehung zur Erweiterung der Koronarien. Die stärksten Erweiterungen werden mit Dosen erzielt, welche nur wenig oder gar nicht den Herzschlag beeinflussen (WEDD).

c) Blutdruck und periphere Gefäße

Der Blutdruck fällt nach i.v. Injektion von Adenosin und AMP bei allen untersuchten Tieren sofort nach Injektion. Der Blutdruckabfall kommt dabei nicht allein durch Herzwirkung, sondern auch durch Beeinflussung verschiedener Körpergefäße zustande. Adenosinverbindungen erweitern die Gefäße des großen Kreislaufs, wahrscheinlich durch direkten Angriff an der glatten Muskulatur. Der Gefäßtonus im gesamten arteriellen System sinkt, so daß der Blutdruck auf Grund einer Abnahme des peripheren Widerstandes fällt (ZIPF; FELIX). Dem abrupten Abfall entspricht ein schneller Anstieg, der durch eine Vermehrung des Minutenvolumens bedingt ist. Der arterielle Blutdruck steigt wieder an, während die Gefäße von Haut, Muskel, Darm und Gehirn vorerst noch erweitert bleiben.

d) Gefäßverengerung durch Adenosinverbindungen

Verengerung bei Injektion von Adenosinverbindungen erfahren hingegen die Lungengefäße sowie die a.femoralis und die a.carotis. Bei letzteren handelt es sich aber nicht um eine aktive, sondern druckpassive Verengerung (EMBDEN). Die isolierte, durchströmte Niere antwortet auf Adenosinverbindungen mit einer Vasokonstriktion und einer Verminderung der Exkretion (BENNET und DRURY; ENGELHARDT und BAJEV).

Nach HOUCK, BING, CRAIG und VISSCHER kommt es jedoch in einer zweiten Phase zu einer starken Vermehrung der Nierendurchblutung und Erhöhung der Filtratmenge bis zur Norm. MARCOU fand die isoliert durchströmte Milz nach Adenosininjektion verkleinert; außer der Gefäßkontraktion kann es sich hierbei um eine unmittelbare Wirkung auf die kontraktile Elemente des Milzgewebes handeln.

Die aufgeführten Reaktionen treten alle unabhängig von einer Entnervung, Vorbehandlung mit Antihistaminika oder Atropin auf (HERBRAND). Sie sind, wenn auch nur in geringerem Maße, auch am Menschen zu erzielen. In Bezug auf die Stärke der Blutdruckwirkung gilt, daß sie auf abspaltbares NH_3 berechnet, mit steigender Phosphorylierung abnimmt. Es ist also Adenosin am wirksamsten; jedoch ist die Ansprechbarkeit verschiedener Tierspezies unterschiedlich (WERLE).

e) glatte Muskulatur

Die Adenosinverbindungen hemmen alle bisher untersuchten glatten Muskeln mit Ausnahme des Meerschweinchenuterus. Adenosin und AMP vermindern den Tonus und die Kontraktionen des Katzen- und Kaninchendünndarmes, erschaffen die Gallenblase und erweitern die Bronchiolen. Sie kontrahieren

ren dagegen den Meerschweinchenuterus (BENNET und DRURY); auf den Uterus der Katze, des Hundes und der Ratte wirken sie dagegen ebenso wie auf andere glatte Muskeln erschlaffend (BARSOUM und GADDUM).

f) pharmakologische Wirkung und chemische Konstitution
Die pharmakologische Wirksamkeit der Adenosinderivate hängt, wie bereits früher erwähnt, einmal vom Phosphorylierungsgrad, zum anderen aber auch von der Intaktheit der Aminogruppe und der Anwesenheit von Ribose ab. So verliert Adenosin bei Abspaltung der Ribose seine pharmakologische Aktivität fast völlig, ebenso bei Abspaltung der Aminogruppe. Die Wirksamkeit der verschiedenen Phosphorylierungsstufen des Adenosins ist bei verschiedenen Tierpezies unterschiedlich. Im allgemeinen läßt sich jedoch sagen, daß die Blutdruckwirkung des Adenosin mit steigender Phosphorylierung sinkt, so daß Adenosin auf den Blutdruck am wirksamsten ist (WEESF), die darmhemmende Wirkung hingegen mit steigender Phosphorylierung zunimmt (DRURY). Den Untersuchungen von FLEISCH verdanken wir die Erkenntnis, daß Adenosinverbindungen noch in einer außerordentlich niedrigen Konzentration, nämlich 1 : 5 000 000, gefäßaktiv sind.

2.) Pharmakologische Untersuchungen des UDPG/UDPGA-Gemisches

Die pharmakologischen Angaben lehnen sich an die Untersuchungen an, die H.P.ZACH mit Rindercolostrum durchführte, aus dem er Uridindiphosphatglukose und Uridindiphosphatgalaktose in äquimolaren Mengen isolierte.

a) Wirkung auf den Blutdruck, die Herzfrequenz und die Koronardurchblutung

aa) Blutdruck

I.v. injizierte UDPG/UDPGA steigert den Blutdruck in ähnlicher Weise wie Adrenalin oder Noradrenalin; der Druckanstieg tritt sofort nach Injektion ein, erreicht steil ansteigend seinen höchsten Wert und sinkt langsam wieder auf Normalwerte ab. Diese Wirkung ist relativ unabhängig von der Narkosetiefe und wird in ihrem Ausmaß nicht durch rasch aufeinanderfolgende Injektionen verändert. Die kleinste Dosis, die an einem narkotisierten Hund noch eine Blutdrucksteigerung von ca. 5 mm Hg hervorruft, beträgt 4 Gamma/kg. Allerdings ist selbst innerhalb einer Tierspezies die Ansprechbarkeit auf UDPG/UDPGA wechselnd.

bb) Herzfrequenz

Nach i.v. Injektion von UDPG/UDPGA verlangsamt sich mit Einsetzen der Blutdrucksteigerung die Herzfrequenz merk-

lich. Mit zunehmendem Druckabfall tritt jedoch wieder Normalisierung der Frequenz ein. Die Frequenzabnahme während der Phase der Druckerhöhung ist dabei dosisabhängig und erreicht bis zu 20 % der Ruhefrequenz. Dosen über 1 mg/kg verursachen Herzarrhythmien.

cc) Koronardurchblutung

Die Koronardurchblutung scheint während der Druckerhöhung stark vermindert zu sein.

b) Abgrenzung von den Katecholaminen

Wie bereits erörtert ist die Blutdrucksteigerung nach UDPG/UDPGA ähnlich der nach Adrenalin und Noradrenalin. Mit folgenden Versuchen grenzte H.P. ZACH die Möglichkeit eines UDPG/UDPGA-Einflusses auf nervöse Blutdrucksteigerung und Katecholaminstoffwechsel ab:

aa) Dosis-Wirkungs-Beziehung

UDPG/UDPGA muß in sehr viel höheren Dosen gegeben werden, um eine Blutdrucksteigerung gleichen Ausmaßes wie nach Adrenalin und Noradrenalin zu erzielen. Das Dosis-Wirkungs-Verhältnis zwischen Adrenalin und UDPG/UDPGA ist bei den einzelnen Tierspezies verschieden. Es variiert, bezogen auf gleiche Gewichtsmengen von UDPG/UDPGA, von etwa

1 : 100 bei Ratten bis auf 1 : 1 000 bei Hunden. Zudem verläuft die Dosis-Wirkungs-Kurve für UDPG/UDPGA viel flacher als bei Adrenalin. Eine Erhöhung von blutdruckwirksamen Dosen von UDPG/UDPGA um ein Vielfaches steigert im Gegensatz zu Adrenalin den Blutdruck nur mäßig, maximal um ca. 70 mm Hg. Eine weitere Steigerung der der Dosis verlängert nur die Druckerhöhung.

bb) UDPG/UDPGA-Wirkung bei Blockade der Reizübertragung
Ausschaltung zentraler Steuerungsmechanismen durch Dekapitation, pharmakologische Blockade der ganglionären Reizübertragung, Unterbrechung der neuromuskulären Reizübertragung durch - bzw. β -Rezeptorenblocker und Atropin beeinflussen nach den Angaben von H.P.ZACH die pharmakologische Wirkung von UDPG/UDPGA nicht. Eine quantitativ unveränderte Blutdruckaktivität nach Kokainisierung spricht sowohl gegen eine katecholaminliberierende als auch eine die Wiederaufnahme von freigesetzten Katecholaminen verzögernde Wirkung von UDPG/UDPGA. Die blutdrucksteigernde Wirkung ist also weder mit einer Beeinflussung der nervösen Blutdrucksteuerung, noch mit einer Einflußnahme auf den Katecholaminstoffwechsel zu erklären.

c) UDPG/UDPGA und biogene Amine

Unterschiedlicher Verlauf der Blutdruckkurven nach Gaben von UDPG/UDPGA, Tyramin, Serotonin, Angiotensin oder Vaso-pressin und fehlende Tachyphylaxie bei raschen Injektio-nen von UDPG/UDPGA schließen die Möglichkeit aus, daß UDPG/UDPGA über die Freisetzung eines dieser Stoffe wirkt.

d) UDPG/UDPGA und seine Wirkung auf glatte Muskulatur

aa) Suspensionsversuche

Im Gegensatz zu allen direkt am Gefäß angreifenden, blut-druckaktiven Substanzen bringt UDPG/UDPGA eine in tem-perierter, mit Sauerstoff durchperlter Jalon-Lösung sus-pendierte Kaninchenaorta auch bei höchster Konzentration nicht zur Kontraktion..

Ein in Tyrode-Lösung suspendiertes Rattenileum wird nach den Untersuchungen von H.P.ZACH durch UDPG/UDPGA ebenso erschlafft wie durch Adrenalin, Noradrenalin oder Iso-proterenol. Das Mengen-Wirkungs-Verhältnis Adrenalin : UDPG/UDPGA beträgt dabei etwa 1 : 300. Am Rattenuterus, Meerschweinchenileum und -samenblase wirkt UDPG/UDPGA dagegen nicht.

bb) Durchströmungsversuche

Durchströmungsversuche an der Hinterextremität eines Hundes zeigten, daß sich bei Zusatz von Adrenalin oder

Noradrenalin zur Perfusionsflüssigkeit die Perfusionsgeschwindigkeit vermindert. Bei Zugabe von 1 Gamma Noradrenalin sistiert der Durchfluß nahezu. UDPG/UDPGA-haltige Tyrode-Lösung verlangsamt die Perfusion ebenfalls. Das Wirkungsverhältnis von Adrenalin : UDPG/UDPGA beträgt bezogen auf gleiche Gewichtsmengen von 1 : 4 500. Diese Verhältnisse liegen viel höher als jene, die bei Vergleich der Blutdruckwirksamkeit von Adrenalin und UDPG/UDPGA ermittelt wurden (1 : 1 000).

Nach Gaben von Papaverin (10 mg/kg) sind i.v. Injektionen von UDPG/UDPGA und anderen vasopressorischen Substanzen in ihrer Wirkung gleichmäßig abgeschwächt.

e) Angriffspunkt des UDPG/UDPGA

Die erschlaffende Wirkung am isolierten Rattenileum, die Herabsetzung der Strömungsgeschwindigkeit an der isoliert perfundierten Hinterextremität, die Abschwächung der Wirkung nach Papaveringaben und die früher erwähnte Verminderung der Koronardurchblutung machen eine direkte Wirkung von UDPG/UDPGA an der glatten Muskulatur wahrscheinlich. Weder den Katecholaminen, noch Serotonin, Angiotensin oder Vasopressin kommt eine Mediatorfunktion zu: auch nach chirurgischer Ausschaltung von Nieren, Nebennieren

Milz, Leber und Hypophyse als möglicher Bildungsstätte von Mediatoren fand H.P.ZACH keine Verminderung der pharmakologischen Aktivität von UDPG/UDPGA. Da UDPG/UDPGA auch ohne Beteiligung von Blut am isolierten Rattenileum eine erschlaffende Wirkung hat, und da eine Tachyphylaxie auch durch rasch aufeinanderfolgende Injektionen nicht zu erreichen ist, scheint eine direkte Reaktion von UDPG/UDPGA mit der glatten Muskulatur zu erfolgen.

f) Vergleiche verschiedener Uridinnukleotide

Vergleichende Untersuchungen mit anderen Pyrimidinnukleotiden ergaben, daß nur Uridindi- und -triphosphatverbindungen blutdrucksteigernd wirken, und daß zudem eine signifikante Blutdruckerhöhung sich wiederum nur bei den Verbindungen zeigt, bei denen die Phosphorsäure mit Zucker oder Zuckerderivaten verestert ist.

V. Diskussion

Das Vorhandensein nicht unbeträchtlicher Mengen an ATP in der Linse findet einmal in Hinblick auf seine Stoffwechselfunktion eine Erklärung. So kommt nach KLETHY und MANDEL dem ATP eine wichtige Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel sowie bei der Biosynthese der Nukleinsäuren, Proteine und Lipide der Linse zu. Neben dieser Stoffwechselfunktion scheint ATP aber primär als Energiequelle, ähnlich wie im Muskel, zu dienen (KLETHY und MANDEL; VAN HEYNINGEN und PIRIE). Möglicherweise übernimmt es eine aktive Funktion bei der Akkomodation. ATPase und Pyrophosphatase bauen es dabei zu dem auch bei der Aufarbeitung der Rinderlinsen gefundenen AMP und Adenosin ab. Die Substitution des verbrauchten ATPs kann bei der Gefäßlosigkeit der Linse nicht vom Blutstrom aus erfolgen. Mittels Myokinase (KLETHY und MANDEL) ist die Linse jedoch in der Lage, aus ADP ATP zu regenerieren, ohne dabei Glukose zu verbrauchen. Die gefundene pharmakologische Wirkung des Linsenhomogenates, nämlich die Blutdrucksenkung durch ATP oder seine Abbauprodukte, dürfte allerdings bei der Gefäßlosigkeit der Linse für diese ohne Bedeutung sein.

Uridindiphosphatglukose und -galaktose sind offenbar zwi-

schenprodukte für die Belieferung der Linse mit Glukose und Galaktose, wobei letztere beim Aufbau komplizierter Verbindungen entweder als solche oder in Form von Galaktosamin oder N-Acetylgalaktosamin benötigt wird. Dabei kommen Glykoproteine, Mukoide und Glykolipide besonders in Betracht. Inwieweit die notwendigen Enzyme in der Linse vorkommen ist bisher nicht näher untersucht, jedoch erscheint es unwahrscheinlich, daß diese hochmolekularen Stoffe auf dem Wege der Diffusion in das Linsengewebe gelangen. Die benötigten Enzyme, so z.B. UDP-Glukose-4-Epimerase, Hexose-1-phosphat-Uridyl-Transferase und UDP-Galaktose-Glukose-Galaktosyl-Transferase, sind also möglicherweise in der Linse selbst vorhanden. Die pharmakologische Wirkung des Gemisches aus UDP-Glukose und UDP-Galaktose dürfte ebenso wie die des ATPs für die Linse ohne Bedeutung sein.

Wahrscheinlich ist der für die Belieferung der erwähnten Stoffe notwendige Enzymapparat für UDP-Glukose und UDP-Galaktose ebenfalls wie beim ATP (DAILY et al.; BERARDI-NIS und DE ROSA) hauptsächlich im Linsenepithel lokalisiert. Eine Untersuchung dieser Frage wäre von besonderem Interesse auch im Hinblick darauf, ob Störungen der Intaktheit der Linse, wie u.a. Kataraktbildung, mit Veränderungen

des Enzymapparates einhergehen.

VI. Zusammenfassung

Rinderlinsen wurden homogenisiert, angesäuert und zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden mittels Chromatographie an Dowex 1 x 8 und Gelfiltration über Sephadex G-25 zwei blutdrucksenkende sowie eine blutdrucksteigernde Substanz isoliert. Spektrophotometrische Untersuchungen erlaubten es, die blutdrucksenkenden Substanzen in die Gruppe der Adenosinnukleotide einzuordnen, die blutdrucksteigernde aber in die der Uridinnukleotide. Enzymatische Methoden wiesen die blutdrucksenkenden Substanzen als Abbauprodukte des ursprünglich in der Rinderlinse vorhandenen ATPs aus, nämlich AMP und Adenosin. Dabei wurden bei einem mittleren Gehalt an Trockengewicht von 32 % (DEUTSCHMANN) und einer geschätzten Ausbeute von 40 % aus 550 g Rinderlinsen ca. 60 mg AMP gewonnen. Die blutdrucksteigernde Substanz konnte an Hand von Uridin-, Phosphat- und Zuckerbestimmungen als ein Gemisch aus gleichen Teilen UDP-Glukose und UDP-Galaktose identifiziert werden. Bei der Aufarbeitung von 550 g Rinderlinsen erhielt man 45 mg des UDPG/UDPGA-Gemisches.

Pharmakologisch kommt dem AMP und dem Adenosin eine herzverlangsamende Wirkung zu. Beide Substanzen wirken zudem

negativ inotrop, jedoch erfolgt bei AMP bereits nach kurzer Zeit auf die Verminderung der Kontraktionskraft des Herzens eine Verstärkung derselben. Weiterhin erzeugen beide Substanzen einen mehr oder weniger vollständigen Herzblock, erweitern die Koronarien und bewirken durch eine verminderte Herzleistung und Erschlaffung der Gefäßmuskulatur eine Abnahme des Blutdrucks. Adenosinverbindungen hemmen weiterhin alle bisher untersuchten glatten Muskeln mit Ausnahme des Meerschweinchenuterus. Die aufgeführten Reaktionen finden sich auch bei Entfernung, Vorbehandlung mit Antihistaminika oder Atropin. Die Wirkung der Adenosinverbindungen ist in allen Fällen von der Intaktheit der Aminogruppe als auch vom Vorhandensein von Ribose abhängig, wobei Adenosin auf den Blutdruck am wirksamsten ist, während z.B. die darmhemmende Wirkung mit steigender Phosphorylierung zunimmt. In der Linse kommt dem ATP einmal eine Funktion im Stoffwechsel zu, zum anderen dient es aber möglicherweise als Energiequelle bei der Akkomodation.

UDPG/UDPGA steigert den Blutdruck, wobei mit Einsetzen der Blutdrucksteigerung sich die Herzfrequenz verlangsamt. Die Koronardurchblutung scheint während der Druckerhöhung vermindert. Die Abgrenzung der Blutdruckwirkung von UDPG/UDPGA

gegenüber der durch Katecholamine erzeugten ist einmal durch den flacheren Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve des UDPG/UDPGA und durch das Dosis-Wirkungs-Verhältnis möglich. UDPG/UDPGA ist zudem nach Dekapitation, pharmakologischer Blockade der ganglionären und neuromuskulären Übertragung, nach Atropingaben und nach Kokainisierung unvermindert wirksam. Zusätzlich kann es hinsichtlich seiner Blutdruckkurve von Tyramin, Serotonin, Angiotensin und Vasopressin abgegrenzt werden. Im Suspensionsversuch zeigt UDPG/UDPGA keine Wirkung an der Kaninchenaorta, am Rattenuterus, Meerschweinchenileum und -samenblase, erschlafft aber ein Rattenileum. UDPG/UDPGA vermindert weiterhin die Perfusionsgeschwindigkeit an der Hinterextremität des Hundes. Die chirurgische Ausschaltung verschiedener Organe schließt zudem einen Mediator bei der Wirkung des UDPG/UDPGA aus, so daß die glatte Muskulatur als dessen direkter Angriffspunkt angenommen werden kann. Blutdrucksteigernd wirken dabei nur Uridindi- und-tri-phosphate, vornehmlich jene, die mit Zucker oder Zuckerderivaten verestert sind. In der Linse scheinen beide Substanzen im Stoffwechsel ihre Funktion zu haben, wobei Uridindiphosphatgalaktose bei der Biosynthese der Glykoproteine, Mukoide und Glykolipide Verwendung findet.

VII. Literatur

ADAM: Methoden der enzymatischen Analyse. H.U.Bergmeyer,
539 (1962)

BARSOUM und GADDUM: The pharmacological estimation of
adenosine and histamine in blood. J. Physiol.,
85, 1 (1935)

BASS: Über die Purinkörper des menschlichen Blutes und
den Wirkungsmodus der 2-Phenyl-4-Chinolincarbon-
säure. Arch. exp. Path. (D.), 76, 40 (1914)

BENNET und DRURY: Further observations to the physiolo-
gical activity of adenine compounds. J. Physiol.,
72, 288 (1931)

BERARDINIS und DE ROSA: Ricerche sulle fosfatasi della
cornea e del cristallino. Atti Soc. oftal. ital.
(sous presse) (1952)

BÜCHER: Advances in Enzymology XIV, 1 (1953)

CARO, DE: Sull'azione biologica dell'acido adenilico del
lievito. Arch. Sci. Biol., 16, 363 (1931)

DAILY et al.: Influence of Microwaves on Certain Enzyme
Systems in the Lens of the Eye. Amer. J. Ophthal.,
34, 1301 (1951)

DEUTSCHMANN: Graefes Arch. Ophthal. 25, 213 (1879)

DRURY: J. Pharm. 50, 157 (1934), Zit. Physiol. Rev. 1936,
XVI

Nucleic acid derivatives and heart beat. J. Physiol.,
74, 147 - 155 (1932)

DRURY und SZENT-GYÖRGYI: The influence upon the heart
of a substance present in heart muscle and other
tissues. J. Physiol., 67, 14 (1929)

The physiological activity of adenine compounds
with especial reference to their action upon the
mammalian heart. J. Physiol., 68, 213 (1929). 78

DUBOIS-FERRIERE: Effet hypotenseur d'infusions intrave-
neuses de composés de l'adénosine. Société de phy-
sique et d'histoire naturelle de Genève. 62, 79
(1945)

EMBDEN: Über die Kreislaufwirkungen körpereigener Sub-
stanzen. Arch. exp. Path. (D.), 167, 50 (1932)

FELIX: Experimentelle und klinische Untersuchungen über
die Kreislaufwirkung der Skelettmuskelextrakte:
Lacarnol und Myostriatol. Bull. int. Acad. polon.
Sci. Lettres, Cl. Sci. math. natur., Ser. A, 393
(1932)

FLEISCH: Une substance vasodilatrice des érythrocytes.
Schweiz. med. Wschr. 68, 223 (1938)

- WJETSCH und WEHER: Die nutritive Gewebssensibilität
als Grundlage der Arbeitshyperämie. Arch. ges.
Phys. 240, 553 (1938)
- GADDUM und SCHILD: Depressor substances in extracts
of intestine. J. Physiol., 83, 1 (1934)
- HERBRAND und JAEGER: Das Adenylsäuresystem 21, 65, 58
(1953)
- HEYNINGEN, VAN und PIRIE: Acid soluble phosphates in
the lens. Biochem. J. 68, 18 - 28 (1958)
- HONEY, RITCHIE und THOMSON: The action of adenosine
upon the human heart. Quart. J. Med. 23, 485
(1930). 79
- HOPPE-SEYLER und THIERFELDER: Handbuch der physiol.
und path. chem. Analyse IV/2, 1113
- HOUCK, BING, CRAIG und VISSCHER: Renale Durchblutungs-
steigerung nach i.v. Injektion von Adenylsäure,
Adenosin und Adenosintriphosphorsäure beim Hund .
Amer. J. Physiol. 153, 159 (1948)
- KLETHY und MANDEL: Les nucléotides libres du cristallin
de veau. Biochim. biophys. Acta 24, 642 - 643 (1957)
- LEVENE und JACOBS: Über Hefenukleinsäuren. Ber. deutsch .
chem. Ges., 42, 2703, 2474 (1909)
- LIPMANN: Advances in Enzymology I, 99 (1941)

- MANDEL, NORDMANN und ZIMMER: Acide nucléique du cristallin. G.R. acad. Sci. Paris 226, 516 - 517 (1949)
- MARCOU: Sur l'action vasculaire élektive de l'adénosine. Comp. Rend. Soc. Biol. 109, 985 (1932)
- MARTIN und DOTY: Determination of inorganic phosphate (Modification of isobutyl alcohol procedure) Anal. Chem. 21, 965 (1949)
- OSTERN und PARNAS: Über die Auswertung von Adenosinderivaten am überlebenden Froschherz. Biochem. Zschr., 248, 389 (1932)
- PARNAS und OSTERN: Über die Herzwirkung von Adeninderivaten, insbesondere von Nukleosiden und Nukleotiden. Klin. Wschr., 11, 1551 - 1552 (1932)
- PASSOW: Über die augendrucksenkende Wirkung körpereigener Substanzen. Arch. f. Augenheilkunde, 104, 490 (1931)
- RIGLER: Pflügers Arch., 226, 697 (1931)
- ROTHMAN: Der Einfluß der Adenosinphosphorsäure auf die Herztätigkeit Arch. exp. Path. (D.) 155, 129 - 138 (1930)
- SCHMIDT: Klin. Wschr., 38, 1244 (1961)
- VELHAGEN: Über das Vorkommen depressorischer Substanzen im Auge. Arch. f. Augenheilkunde 104, 546 (1931)

- WALLENFELS et al.: Biochem. Zschr.. 335, 559 (1961)
- WEDD: The action of adenosine and certain related substances on the coronary flow of the perfused rabbit's heart. J. Pharm. (A.), 41, 355 (1931)
- WEESE: Zur biologischen Auswertung des Kallikreins. Arch. exp. Path., 173, 36 (1933)
- WERLE: Körper eigene kreislaufaktive Stoffe. Oppenheimer Handbuch Erg. W., III, 1102 (1936)
- WERLE, SCHMAL und ZACH: Identifizierung des blutdrucksteigernden Prinzips des Colostrums als Nukleotid. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. u. exp. Path. 259, 48 (1967)
- ZACH: Identifizierung des blutdrucksteigernden Prinzips des Colostrums als Nukleotid. Inaugural-Dissertation München, 24 - 35 (1968)
- ZIPF: Verh. dtsch. Ges. inn. Med., 44, 70 (1932)

Herrn Prof.. Dr.. Dr.. E.. Werle danke ich für die Überlassung des Themas und die sachliche und wertvolle Beratung bei der Ausführung der Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank Herrn A. Schmal für die bereitwillige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche sowie Fräulein E. Thiele für die Anfertigung der Photographien.

Ich wurde am 11.7.1945 als drittes Kind des Diplom-Ingenieurs Hans-Jochen Keßler und seiner Frau Erna, geb. Schwiesau, in Suhl/Thüringen geboren. Die Tätigkeit meines Vaters brachte häufige Versetzungen mit sich, so daß unsere Familie nacheinander nach Magdeburg, Burgdorf, Hannover und Frankfurt verzog. In Frankfurt wurde ich 1951 in die Volksschule eingeschult und legte dort nach 4 Jahren die Aufnahmeprüfung am Schiller-Gymnasium ab. Nach einem weiteren Jahr zogen wir 1956 nach München um, wo ich zunächst die Winthir-Oberrealschule besuchte und dann am Theodolinden-Realgymnasium 1964 das Abitur bestand. Ich studierte anschließend an der Ludwigs-Maximilian-Universität München Medizin und bestand 1967 die medizinische Vorprüfung. Zur Zeit bereite ich mich auf das medizinische Staatsexamen und die Promotion vor.

München, Februar 1971

